

35.C15718



1645
PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

NOBUKO YAMAMOTO ET AL.

Application No.: 09/942,596

Filed: August 31, 2001

For: METHOD FOR ANALYZING
BASE SEQUENCE OF
NUCLEIC ACID

)
:
Examiner: Not Yet Assigned

)
:
Group Art Unit: 1645

)
:
:

)
:
:

)
:
:

)
:
:

) December 12, 2001

RECEIVED
DEC 17 2001
TECH CENTER 1600/2900

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

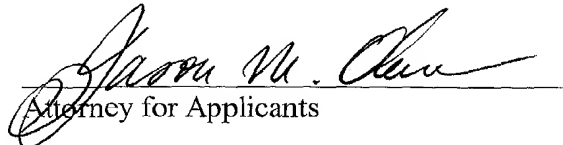
Sir:

In support of Applicants' claim for priority under 35 U.S.C. § 119, enclosed is
a certified copy of the following foreign application:

2000-263506, filed August 31, 2000.

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our address given below.

Respectfully submitted,


Attorney for Applicants

Registration No. 48,512

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
Facsimile: (212) 218-2200

NY_MAIN 224284 v 1

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 8月31日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-263506

出 願 人

Applicant(s):

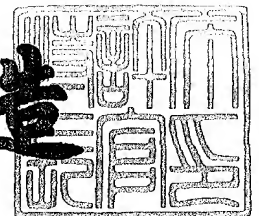
キヤノン株式会社

RECEIVED
DEC 17 2001
TECH CENTER 1600/2900

2001年 9月11日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3083541

【書類名】 特許願

【整理番号】 3888012

【提出日】 平成12年 8月31日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 核酸の塩基配列の解析方法

【請求項の数】 8

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 山本 伸子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 岡本 尚志

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 鈴木 智博

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】 核酸の塩基配列の解析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 標的一本鎖核酸の所定の部位の、未知の塩基配列を特定する方法であって、

(a) 該未知の塩基配列の予想される複数の塩基配列の各々に対して相補的な塩基配列を有する 1 番～n 番 ($n \geq 2$) の複数種の一本鎖核酸プローブの各々が基板上に互いに隔離されるように配置されているプローブアレイを用意する工程；

(b) 該一本鎖核酸プローブの内の 1 つが有する塩基配列に対して完全相補的な塩基配列を有し、かつ蛍光標識が施された標識化一本鎖核酸を含む第 1 のサンプルと該プローブアレイとを互いに相補的な一本鎖核酸同士が二本鎖核酸を形成する条件下で反応させ、未反応の標識化一本鎖核酸を除去したのちに、該アレイから観察される蛍光強度を該プローブアレイ上の各々の一本鎖核酸プローブについて測定し、該プローブアレイ上の各々の 1 本鎖核酸プローブの位置とその蛍光特性との関係を示す第 1 のテンプレートパターンを得る工程；

(c) 他の全ての一本鎖核酸プローブのそれぞれについて、該ステップ (b) と同一の操作を行ない、該プローブアレイ上の 1 本鎖核酸プローブが各々の塩基配列に対して完全相補的な一本鎖核酸と二本鎖核酸を形成したときの該プローブアレイ上の各々の 1 本鎖核酸プローブの位置とその蛍光特性との関係を示す第 2 ～第 n のテンプレートパターンを得る工程；

(d) 該プローブアレイと該標的一本鎖核酸を含む第 2 のサンプルとを該テンプレートパターンを得た条件と同じ条件の下で反応させ、次いで蛍光の有無及び強度を該プローブアレイ上の各々の塩基配列の一本鎖核酸プローブについて測定し、該プローブアレイ上の各々の 1 本鎖核酸プローブの位置とその蛍光特性との関係を示すサンプルパターンを得る工程；

(e) 該サンプルパターンを上記工程 (b) 及び (c) で得た n 個のテンプレートパターンと対比し、該パターンと実質的に一致するテンプレートパターンがある場合に、そのテンプレートパターンの作成に用いた一本鎖核酸の塩基配列を

該標的一本鎖核酸の、未知の塩基配列として特定する工程、
を有することを特徴とする標的一本鎖核酸の、所定の部位の、未知の塩基配列を
特定する方法。

【請求項 2】 標的一本鎖核酸の所定の部位の、未知の塩基配列を特定する
方法であって、

(a) 該未知の塩基配列の予想される複数の塩基配列の各々に対して相補的な
塩基配列を有する 1 番～n 番 ($n \geq 2$) の複数種の一本鎖核酸プローブの各々が
基体上に互いに隔離されるように配置されているプローブアレイを用意する工程
；

(b) 該一本鎖核酸プローブの内の 1 番目の塩基配列に対して完全相補的な塩
基配列を有し、かつ標識が施された一本鎖核酸を含む第 1 のサンプルと該プロー
ブアレイとを互いに相補的な一本鎖核酸同士が二本鎖核酸を形成する条件下で反
応させ、観察される蛍光を該プローブアレイ上の各々の塩基配列の一本鎖核酸プ
ローブについて測定し、該プローブアレイ上の各々の 1 本鎖核酸プローブの位置
とその蛍光特性との関係を示すテンプレートパターン I を得る工程；

(c) 得られた第 1 のテンプレートパターンを解析し、各位置のプローブとミ
スマッチ塩基対数 (i) を有する二本鎖核酸の蛍光量の平均値 (F_i) を算出する
工程；

(d) ミスマッチのない完全相補的な二本鎖核酸の蛍光量 (F_0) と、1 塩基ミ
スマッチを有する二本鎖核酸の蛍光量の平均値 (F_1) との差 ($F_{1,0}$) を求め、さ
らに、($i+1$) 塩基ミスマッチを有する二本鎖核酸の蛍光量 (F_{i+1}) と i 塩基ミ
スマッチの蛍光量 (F_i) の差 ($F_{i+1,i}$) を求め、 $F_{i,i+1} \ll F_{i-1,i}$ となるよう
な i を設定する工程；

(e) 第 2 番目のプローブの塩基配列に対して、ミスマッチ塩基対の数が i 以
下になる塩基配列を有する一本鎖核酸プローブの基体上の位置をポジティブとし
、 $i+1$ 以上のミスマッチを有する塩基配列のプローブの基体上の位置をネガテ
ィブとし、ポジティブの位置が形成するテンプレートパターン II を得る工程；

(f) (e) と同一の操作を他のすべての一本鎖核酸プローブについて行い、
ミスマッチ塩基対の数が i 以下になる塩基配列を有する一本鎖核酸プローブの基

体上の位置が形成するテンプレートパターンIII～nを得る工程；

(g) 該プローブアレイと該標的一本鎖核酸を含むサンプルとを該第1のテンプレートパターンを得た条件と同じ条件の下で反応させ、蛍光の有無及び強度を該プローブアレイ上の各々の塩基配列の一本鎖核酸プローブについて測定し、該プローブアレイ上の各々の1本鎖核酸プローブの位置とその蛍光特性との関係を示すパターンを得る工程；

(h) 該パターンを上記工程(b) (e) 及び(f) で得たn個のテンプレートパターンと対比し、該パターンと実質的に一致するテンプレートパターンがある場合に、そのテンプレートパターンに対応する一本鎖核酸の塩基配列を該標的一本鎖核酸の、未知の塩基配列として特定する工程、
を有することを特徴とする標的一本鎖核酸の、所定の部位の、未知の塩基配列を特定する方法。

【請求項3】 該プローブアレイと該標的一本鎖核酸を含むサンプルとを該第1のテンプレートパターンを得た条件と同じ条件の下で反応させた結果得られる該アレイの各々のサイトから得られる蛍光の強度を F_i をしきい値として二値化し、該プローブアレイ上の各々の1本鎖核酸プローブの位置とその蛍光特性との関係を示すパターンを得る工程を更に備えている請求項2に記載の方法。

【請求項4】 該プローブアレイ上のプローブの長さが8merから30merの長さである請求項2記載の方法。

【請求項5】 該プローブアレイ上のプローブの長さが12merから25merの長さである請求項4記載の方法。

【請求項6】 前記ミスマッチの数(i)が1である請求項2に記載の方法。

【請求項7】 第1のテンプレートパターンを得るために1番目の塩基配列に対して完全相補的な塩基配列を有し、かつ蛍光標識を施された一本鎖核酸を含む第1のサンプル及び標的一本鎖核酸を含むサンプルとプローブアレイとを反応させる工程において、プローブアレイ基板をサンプルを含む溶液中で熱変性し、その後基板をサンプル溶液に浸したまま、二本鎖形成反応に適した温度に降下させてハイブリダイゼーションを行う工程を更に有する請求項1～6のいずれかに

記載の反応。

【請求項 8】 プローブアレイ上のプローブの長さが18merであり、熱変性を行う温度が70℃以上であり、二本鎖形成反応を行う温度が40℃以上であり、その時のサンプル溶液に100 mMの食塩が含まれている請求項7に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はDNA診断及び治療に使用されるDNAチップを用いた核酸塩基配列を特定する方法に関する。

【0002】

【従来技術】

核酸等の物質の配列を決定し、或いはその配列をチェックする手法のひとつにDNAアレイを利用する方法がある。USP5445934には、1インチ角に10万個以上のオリゴヌクレオチドプローブを結合したDNAアレイの開示がある。このようなDNAアレイは、少量の検体で一度に多項目を検査できるという利点がある。このようなDNAチップ上に、蛍光標識した検体を流すと、上記DNAチップ上のプローブと相補的な配列を有するDNA断片はプローブと結合し、その部分だけが蛍光により識別でき、DNA試料中のDNA断片の配列を解明することができる。

【0003】

Sequencing by Hybridization (SBH) 法は、このようなDNAアレイを利用し塩基配列を調べる方法で、USP5202231にその詳細が記載されている。SBH法では、ある長さについて可能なオリゴヌクレオチドの全配列を基板上に並べ、検体DNAとのハイブリダイゼーション反応によって形成される完全に相補的なハイブリッド体を検出するもので、完全に相補的なハイブリッド体のセットを得れば、そのセットはある配列について1塩基ずつずれた配列の集合になるはずであり、それらを解析することにより判定を行うものである。

【0004】

原理的には、検体DNA中に、ある特定の配列があるかどうかを調べるためには、その配列と相補的な配列をプローブとしてハイブリダイゼーション反応を行って結合の有無を調べることとなる。しかし、実際には、1種類のプローブでハイブリッドの有無を調べ、それを基にひとつの検査項目として判定することは非常に難しい。なぜなら、完全に相補的なハイブリッド体を比べると、ハイブリッド体由来の蛍光はそれぞれの配列により強度が異なる。特に、塩基配列中のGC含量はハイブリッド体の安定性に大きな影響を与える。しかも、完全に相補的ではなく1塩基のミスマッチを含む配列でも、ハイブリッド体を形成し、蛍光を発する。そのハイブリッド体は、同じ配列間で比較すると、完全マッチのものより安定性が低く蛍光は弱くなるが、完全に相補的な他のハイブリッド体よりも蛍光強度が高いということはよく見られる現象である。また、1塩基ミスマッチとはいっても、ハイブリッド体のどの位置にミスマッチを含むかによってその安定性は大きく変化する。末端にミスマッチを含む場合には、比較的安定なハイブリッド体を得られるが、ハイブリッド体の真ん中に含む場合には相補鎖の連続部分が分割されるために不安定になる。このように、ハイブリッド体の安定性に関してはいろいろな要因が絡み合い、完全に相補的か否かを判定する蛍光強度の絶対値（基準値）というものが得られないのが現状である。また、1塩基ミスマッチを完全に排除し、完全マッチからのみの蛍光を検出する条件というものも得られていないといえる。

【0005】

配列によるハイブリッド体の安定性の違いを解消するための工夫として、Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.82, pp1585-1588 (1985)にはtetramethylammonium chlorideを用いる方法が記載されている。しかし、上記問題点を完全に解消するには至っていない。

【0006】

そこで、完全マッチか否かを判定する方法として、Science vol.274 p610-614, 1996には15merのオリゴヌクレオチドのプローブ配列の真ん中に1塩基ミスマッチを配した配列を用意し、完全マッチと1塩基ミスマッチとのハイブリッド由来の蛍光強度を比較し、完全マッチの方が強度が強いときにポジティブと判定す

るような方法が記載されている。

【0007】

さらに、USP5733729には上記方法に加えてより正確な判定を行うための方法として、コンピューターを用いて、得られたハイブリッド体の蛍光強度の比較から検体の塩基配列を知るための方法が開示されている。

【0008】

これらの方法では、調べたい位置の核酸塩基部分をプローブの真ん中に設定し、その位置に必ず4種類のヌクレオチドセットを用意すること、及びそのようなプローブのセットを1塩基ずつずれた配列について用意することが必要とされる。そして上述のような15merのオリゴヌクレオチドを用い、真ん中に1塩基ミスマッチを有する他の3種類のプローブとの比較を行って完全マッチか否かを判定するという方法で、それぞれの安定性を、理論的に或いは経験的に評価し、より精度を得ることができるとされている。また、調べたい領域の塩基の長さがLであれば、プローブ数は $4 \times L$ （5塩基であれば20種）になる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

上記のミスマッチを利用する方法は同じ配列の同じ位置の1塩基ミスマッチとの比較を行うことで判定が比較的容易である点、及びプローブ数が少なくても良い（SBHでは同様な解析に1024種のプローブが必要）点において優れた方法ではあるが、同じ領域に2塩基ミスマッチがある場合、或いは、塩基の欠損、挿入がある場合には正確な情報が得られないという重大な欠点がある。

【0010】

一方、SBH法は、上記問題点を解決し、原理的にはどのような変異にも対応可能な方法ではあるが、その判定はかなり難しい。それは、ある配列の完全マッチよりも別の配列の1塩基ミスマッチの方が強度が強いことや、1塩基ミスマッチとはいっても、配列中のどの位置にミスマッチがあるかによって、そのハイブリッド体の安定性が大きく異なることによる。その結果、完全マッチ、1塩基ミスマッチ、2塩基ミスマッチ（連続、不連続）は蛍光強度から単純に判断することはできず、理論的な予測、各種配列との比較、経験的なパラメーターの蓄積と

いった複雑な解析を必要とする。

【0011】

さらに、ひとつひとつのプロープに関してそのハイブリッド体の強度を計測し、その値を解析して遺伝子配列を決定、判定するためには、アレイを読みとる検出装置の他に大がかりなコンピューター装置を必要とし、DNAアレイを利用した簡便な遺伝子診断を行う上で大きな障害となる。

【0012】

このような問題点に鑑み、本発明では、複雑な解析を必要とせず、正確に遺伝子の配列を決定する方法を提供する。

【0013】

【課題を解決するための手段】

上述のように、ハイブリッド体の強度は種々の要因によって支配されており、15merから20mer程度の長さのプロープを用いた場合に、1塩基ミスマッチを有するハイブリッド体の蛍光強度を完全に除くことは事実上困難である。それに対し、2塩基ミスマッチを有する配列は、2塩基ミスマッチの位置、連続、不連続にかかわらず、ハイブリッド体の形成を抑制する条件を得ることが比較的容易である。

【0014】

本発明は、このような発見に基づいてなされたものであって、完全マッチ配列のスポットに加えて、所定のミスマッチ数、例えば1塩基ミスマッチの配列を有するハイブリッド体のスポットも、ポジティブと見なす点にひとつの特徴を有する。

【0015】

つまり、本発明の一実施態様にかかる標的一本鎖核酸の、所定の部位の、未知の塩基配列を特定する方法は、

(a) 該未知の塩基配列の予想される複数の塩基配列の各々に対して相補的な塩基配列を有する1番～n番 ($n \geq 2$) の複数種の一本鎖核酸プロープの各々が基体上に互いに隔離されるように配置されているプロープアレイを用意する工程

;

(b) 該一本鎖核酸プローブの内の1つが有する塩基配列に対して完全相補的な塩基配列を有し、かつ蛍光標識が施された標識化一本鎖核酸を含む第1のサンプルと該プローブアレイとを互いに相補的な一本鎖核酸同士が二本鎖核酸を形成する条件下で反応させ、未反応の標識化一本鎖核酸を除去したのちに、該アレイから観察される蛍光強度を該プローブアレイ上の各々の一本鎖核酸プローブについて測定し、該プローブアレイ上の各々の1本鎖核酸プローブの位置とその蛍光特性との関係を示す第1のテンプレートパターンを得る工程；

(c) 他の全ての一本鎖核酸プローブのそれぞれについて、該ステップ(b)と同一の操作を行ない、該プローブアレイ上の1本鎖核酸プローブが各々の塩基配列に対して完全相補的な一本鎖核酸と二本鎖核酸を形成したときの該プローブアレイ上の各々の1本鎖核酸プローブの位置とその蛍光特性との関係を示す第2～第nのテンプレートパターンを得る工程；

(d) 該プローブアレイと該標的一本鎖核酸を含む第2のサンプルとを該テンプレートパターンを得た条件と同じ条件の下で反応させ、次いで蛍光の有無及び強度を該プローブアレイ上の各々の塩基配列の一本鎖核酸プローブについて測定し、該プローブアレイ上の各々の1本鎖核酸プローブの位置とその蛍光特性との関係を示すサンプルパターンを得る工程；

(e) 該サンプルパターンを上記工程(b)及び(c)で得たn個のテンプレートパターンと対比し、該パターンと実質的に一致するテンプレートパターンがある場合に、そのテンプレートパターンの作成に用いた一本鎖核酸の塩基配列を該標的一本鎖核酸の、未知の塩基配列として特定する工程、を有することを特徴とするものである。

【0016】

また、本発明の他の実施態様は、例えば1塩基ミスマッチと2塩基ミスマッチハイブリッド体の蛍光強度との間にしきい値(threshold)を設け、ポジティブとネガティブに区別する点にひとつの特徴を有する。係る他の実施態様は、標的一本鎖核酸の所定の部位の、未知の塩基配列を特定する方法であって、

(a) 該未知の塩基配列の予想される複数の塩基配列の各々に対して相補的な塩基配列を有する1番～n番($n \geq 2$)の複数種の一本鎖核酸プローブの各々が

基体上に互いに隔離されるように配置されているプローブアレイを用意する工程；

(b) 該一本鎖核酸プローブの内の1番目の塩基配列に対して完全相補的な塩基配列を有し、かつ標識が施された一本鎖核酸を含む第1のサンプルと該プローブアレイとを互いに相補的な一本鎖核酸同士が二本鎖核酸を形成する条件下で反応させ、観察される蛍光を該プローブアレイ上の各々の塩基配列の一本鎖核酸プローブについて測定し、該プローブアレイ上の各々の1本鎖核酸プローブの位置とその蛍光特性との関係を示すテンプレートパターンIを得る工程；

(c) 得られた第1のテンプレートパターンを解析し、各位置のプローブとミスマッチ塩基対数(i)を有する二本鎖核酸の蛍光量の平均値(F_i)を算出する工程；

(d) ミスマッチのない完全相補的な二本鎖核酸の蛍光量(F_0)と、1塩基ミスマッチを有する二本鎖核酸の蛍光量の平均値(F_1)との差($F_{1,0}$)を求め、さらに、(i+1)塩基ミスマッチを有する二本鎖核酸の蛍光量(F_{i+1})とi塩基ミスマッチの蛍光量(F_i)の差($F_{i+1,i}$)を求め、 $F_i, i+1 \ll F_{i-1,i}$ となるようなiを設定する工程；

(e) 第2番目のプローブの塩基配列に対して、ミスマッチ塩基対の数がi以下になる塩基配列を有する一本鎖核酸プローブの基体上の位置をポジティブとし、i+1以上のミスマッチを有する塩基配列のプローブの基体上の位置をネガティブとし、ポジティブの位置が形成するテンプレートパターンIIを得る工程；

(f) (e)と同一の操作を他のすべての一本鎖核酸プローブについて行い、ミスマッチ塩基対の数がi以下になる塩基配列を有する一本鎖核酸プローブの基体上の位置が形成するテンプレートパターンIII～nを得る工程；

(g) 該プローブアレイと該標的一本鎖核酸を含むサンプルとを該第1のテンプレートパターンを得た条件と同じ条件の下で反応させ、蛍光の有無及び強度を該プローブアレイ上の各々の塩基配列の一本鎖核酸プローブについて測定し、該プローブアレイ上の各々の1本鎖核酸プローブの位置とその蛍光特性との関係を示すパターンを得る工程；

(h) 該パターンを上記工程(b) (e) 及び (f) で得たn個のテンプレ

トパターンと対比し、該パターンと実質的に一致するテンプレートパターンがある場合に、そのテンプレートパターンに対応する一本鎖核酸の塩基配列を該標的一本鎖核酸の、未知の塩基配列として特定する工程、
を有することを特徴とするものである。

【0017】

そしてこのような態様を採用することで、上記ポジティブと区別されたスポットが基板上で形成するパターンを画像として得、それを予想パターンと比較することによりその配列を解析することができ、未知の遺伝子配列を容易に特定することができる。

【0018】

また、本発明においては、さらにこのような1塩基ミスマッチと2塩基ミスマッチを完全に区別するためのハイブリダイゼーション反応条件を提示する。

【0019】

【発明の実施の形態】

以下本発明について具体的に説明する。

(蛍光像による判定)

本発明の一実施態様では、ミスマッチを起こす可能性のある核酸塩基が近接して存在する場合に特に有効である。ここでは、癌抑制遺伝子p53の238番目、239番目のアミノ酸配列に対応する塩基配列を含む^{5'}GATGGGNCCTCNGTTTCAT^{3'}を例として説明する。上記例は、発明の概要を説明するためのひとつの形態であり、いかなる形態のアレイにおいても、本発明は画像として処理するという点では同様な概念を提示しており、何らアレイの形態、プローブの配置を限定するものではない。また、当然のことながら、SBH法も本発明の解析対象である。

【0020】

上記例において、Nで記した各塩基部分を4種の塩基(A、G、C、T)に置き換えたプローブの完全セットを用意した場合、つまり、3カ所(連続している必要はない)の塩基について調べる場合には、 $4^3 = 64$ 種の、5カ所の場合には $4^5 = 1024$ 種のプローブが基板上に並ぶ。

【0021】

64種のプローブを用いた場合の配置例を図1に示す。

【0022】

64種プローブアレイを4分割した左上の領域には、最初のNがAであるプローブ（プローブ番号1～16）が配置され、左下にはGであるようなプローブ（プローブ番号17～32）が配置される。同様に、右上はC（プローブ番号33～48）、右下はT（プローブ番号49～64）となる。各領域の中で、2番目のNがAであるようなプローブは左から数えて1列目、Gは2列目、Cは3列目、そしてTは4列目に位置する。また、3番目のNがAであるようなプローブは上から数えて1行目、Gであるような配列は2行目、同様にCが3行目、Tが4行目に配置される。その結果、例えば、 $5' \text{GATGGGACTCAAGTTCAT} 3'$ といった配列は最も左上のスポットに対応する。また、正常な遺伝子に相当する配列である $5' \text{ATGAACCGGAGGCCCATC} 3'$ は、右から3列目、上から3行目の位置にあるプローブDNA $5' \text{GATGGGCCTCCGGTTCAT} 3'$ とハイブリッドを形成することが期待される。

【0023】

以下、1塩基ミスマッチをポジティブスポットとして扱う場合について説明する。この場合に、完全マッチ配列が42番のプローブ（正常遺伝子）であるとすると、ポジティブと判断される1塩基ミスマッチ配列は、塗りつぶされた9カ所となり、完全マッチと合わせて図2に示されるようなパターンを形成することが予想される。

【0024】

これに対し、標的核酸の特定すべき配列に対する変異配列では例えば図3に示すようなパターンの変化が見られる。

【0025】

本発明では、このような完全マッチと1塩基ミスマッチからなる予想される蛍光パターン像を予めコンピュータ等の記憶装置に入力しておき、所定の方法で得られる蛍光像との比較により判定を行う。この時、それぞれのポジティブスポットの蛍光強度の詳細な定量データは必要ない。単にあるしきい値に対するポジティブ、ネガティブの判定のみで良く、簡便かつコンピュータ等を使用した自動化された判定が可能となる。

【0026】

(しきい値の設定)

18mer程度のプローブを用いる場合には、そのしきい値を通常1塩基ミスマッチの蛍光強度と2塩基ミスマッチによる蛍光強度との間に設定するのが好ましい。蛍光強度はそれぞれの配列組成、反応条件により異なるが、最も高い蛍光強度(通常は完全マッチのもの)の50%から25%の値、より好適には30%から20%をしきい値として設定すると良い。プローブ長が短い場合には、しきい値はさらに低くなる。

【0027】

3塩基ミスマッチを含むものは最大値の1割以下の蛍光量であり、完全に区別できる。

【0028】

しきい値を最大蛍光量の1/4に設定した場合、完全マッチ配列及び1塩基ミスマッチ配列を4、2塩基ミスマッチ配列を1、3塩基ミスマッチ配列を0として蛍光強度の分布を予想すると図4のようになる。

【0029】

より具体的な判定方法について上記例について説明する。

【0030】

ハイブリダイゼーション反応が極めて選択的に進行した場合には、強い蛍光は1点(完全マッチ)に集中する。次に感度を徐々に上げると、上記配置例では図3から予想されるように、1塩基ミスマッチは完全マッチを中心に縦横のライン状に並ぶはずである。しかし、実際の蛍光像は必ずしも強いスポットを中心に縦横それぞれ3個ずつライン状に並ぶとは限らない。1塩基ミスマッチ間の安定性の違いにより、6個がすべて同じ程度の強度を有するとは限らないため、検出されないスポットもあるが、少なくともこれらのライン状にいくつかスポットが見えるはずである。その時、残る3個の1塩基ミスマッチも予想される位置に強度の濃淡はあるものの検出できる。

【0031】

また時には、完全マッチと1塩基ミスマッチが同程度の蛍光強度を与え、最初

から完全マッチと1塩基ミスマッチとの10スポットからなる予想される像に近い画像が得られる。

【0032】

2塩基ミスマッチは、時としてしきい値を越える場合があるが、そのような場合でも、予想パターンからのずれとして容易に判別できる。

【0033】

このように予想パターンと実際に得られる蛍光像との比較により判定する本発明の方法は、検体遺伝子中の変異の有無を容易に判定でき、さらにどの塩基（複数でも可）が何に変異しているか変異の内容を同時に判定が可能であるという特徴を持つ。

【0034】

また、64種のプローブによるハイブリダイゼーション反応の結果を、パターンで評価するという考えは、1スポットのみで判断する場合に比べ、より確実な判断という点で有利である。64種のDNAプローブとのハイブリッドは、それぞれの配列により熱安定性が異なるため、必ずしも完全マッチの場合が圧倒的に安定で強い蛍光を発するという保証はない。また、基板上のゴミやハイブリダイゼーション反応時のアーティファクトといったことが原因で、どれが最強のスポットで完全マッチのスポットであるか判断できないことも多い。その点パターンでの判定は、多少の蛍光量のばらつきがあってもそれを補える。

【0035】

（プローブ長）

本発明に用いられるプローブ長は8merから30mer程度、より好ましくは、12merから25merである。8mer以下では1塩基ミスマッチを有するハイブリッド体の安定性は低く、完全マッチ由来の蛍光量の方が優位である。また、30merより長いプローブでは2塩基ミスマッチ体の蛍光が、場合によっては（例えば、両末端にミスマッチ箇所が存在する場合）1塩基ミスマッチよりも強くなる。

【0036】

（ハイブリダイゼーション反応条件）

上記良好なしきい値を与えるハイブリダイゼーション反応の条件としては、基

板全体を検体溶液中に浸したまま加熱し、基板上のDNAプローブと検体DNAの双方を同時に熱変性し、その後徐々に冷却してやや高めの温度でハイブリダイゼーション反応を行う。反応時の塩濃度は100mM以下が望ましい。

【0037】

熱変性を行うための温度としては、60℃以上、好ましくは80℃以上が適当である。熱変性のための温度の設定は、DNAアレイ基板自体の安定性、検体の長さ、濃度、標識化合物の種類に依存して決められる。例えば、樹脂を塗布しその樹脂とDNAとを反応させて結合したような基板では、高温にすることにより、樹脂層が破壊されることがある。それに対し、シランカップリング剤を作製過程で用いた基板は、熱に対し比較的安定であり、さらに高温にすることができる。検体DNAが一本鎖の場合には、70℃以上で分子内二本鎖構造はほぼ解消されと考えられるが、二本鎖の場合或いは検体DNAが長い一本鎖DNAの場合には、さらに温度を上げたり、ホルムアミド等の変性剤を加えて一本鎖への解離を促進する必要がある。熱変性に要する時間は10分以上、好ましくは30分程度が良い。

【0038】

ハイブリダイゼーション反応の条件は、プローブ長、配列、検体の種類を考慮し、常法に従い温度や塩濃度を変えることによって行われる。本発明のような、極めて類似した配列を区別して認識するための条件として好適に用いられるのは、食塩100mMを含む溶液中、45℃で3時間以上である。しかし、反応時間は検体濃度により大きな影響を受け、上記反応条件に限らない。高濃度の検体ならば3時間以内で充分判定が可能であり、また、検体溶液が希薄であれば、10時間以上の反応時間が必要である。ホルムアミドを加える場合には食塩濃度を高める必要がある。

(DNAアレイ基板の製法)

本ハイブリダイゼーション反応を良好に進めうるDNAアレイの作製方法として、以下にその例を示す。しかし、本発明の趣旨は、基板上のハイブリダイゼーションパターンを評価し、検体の塩基配列を決めるための簡便な方法を示すことであり、基本的に、基板の作製方法にはこだわらない。

【0039】

DNAアレイでは、DNAプローブを基板表面にある官能基との反応により共有結合により固定する。該官能基とDNAとの結合様式として、例えば、ガラス表面のマレイミド基とDNA末端のSH基との結合反応を行わせる方法について示す。

【0040】

マレイミド基の導入方法としては、まず、ガラス基板にアミノシランカップリング剤を反応させ、次にそのアミノ基とEMCS試薬 (N-(6-Maleimidocaproyloxy) succinimide: Dojin社製) との反応によりマレイミド基を導入する。DNAへのSH基の導入は、DNA自動合成機上5'-Thiol-ModifierC6 (Glen Research社製) を用いる事により行うことができる。

【0041】

該DNA溶液をインクジェット法により基板上にスポットを形成させ、該DNA基板上のマレイミド基とDNA末端のSH基との反応により、プローブDNAを固定化する。

【0042】

インクジェット法によるマレイミド基を有するガラス基板への吐出に適したDNA溶液としては、グリセリン、尿素、チオジグリコール又はエチレングリコール、アセチレノールEH (川村ファインケミカル社製)、イソプロピルアルコールを含む溶液が好ましい。特にグリセリン7.5%、尿素7.5%、チオジグリコール7.5%、アセチレノールEH1% (いずれも質量%) を含む溶液が好ましい。

【0043】

DNAが結合したアレイ基板は、2%ウシ血清アルブミン水溶液中に2時間浸し、ブロッキング反応を行った後、ハイブリダイゼーション反応に用いられる。

【0044】

【実施例】

以下に実施例により、より詳細に説明する。

(実施例1: パターン認識 I)

1. プローブの設計

癌抑制遺伝子である p 5 3 遺伝子の248番目、249番目のアミノ酸配列に対応する塩基配列CGGAGGの中での変異の中で頻度が高いのは、1番目のCがTに、2番目のAがGに、そして249番目のアミノ酸3番目のGがTに変異している場合であることが知られている。そこで、この3カ所の塩基配列に着目して64種のプローブを設計した。

【0045】

つまり、プローブ全長を18merとし、その真ん中にこの変異を含む6塩基を位置させ、その前後を共通配列で挟んだ構造で、5' ATGAACNNGAGNCCCATC^{3'}である。ここで、Nと表した部分が4種の核酸塩基であるA、G、C、Tに対応する。プローブDNAは、検出したい配列（上記配列）と相補的な配列であるので、実際には、5' GATGGGNCCTCNGTTCAT^{3'}となる。

【0046】

図1には64種DNAプローブのDNAアレイ上での配置図を示した。各配列（配列番号：1～64）を具体的に表1に示す。

【0047】

【表 1】

配列番号	配列	配列番号	配列
1	GATGGGACTCAAGTTCAT	33	GATGGGCCTCAAGTTCAT
2	GATGGGACTCAGGTTTCAT	34	GATGGGCCTCAGGTTTCAT
3	GATGGGACTCACGTTTCAT	35	GATGGGCCTCACGTTTCAT
4	GATGGGACTCATGTTTCAT	36	GATGGGCCTCATGTTTCAT
5	GATGGGACTCGAGTTCAT	37	GATGGGCCTCGAGTTCAT
6	GATGGGACTCGGGTTCAT	38	GATGGGCCTCGGGTTCAT
7	GATGGGACTCGCGTTCAT	39	GATGGGCCTCGCGTTCAT
8	GATGGGACTCGTGTTCAT	40	GATGGGCCTCGTGTTCAT
9	GATGGGACTCCAGTTCAT	41	GATGGGCCTCCAGTTCAT
10	GATGGGACTCCGGTTCAT	42	GATGGGCCTCCGGTTCAT
11	GATGGGACTCCCGTTCAT	43	GATGGGCCTCCCGTTCAT
12	GATGGGACTCCTGTTCAT	44	GATGGGCCTCCTGTTCAT
13	GATGGGACTCTAGTTCAT	45	GATGGGCCTCTAGTTCAT
14	GATGGGACTCTGGTTCAT	46	GATGGGCCTCTGGTTCAT
15	GATGGGACTCTCGTTCAT	47	GATGGGCCTCTCGTTCAT
16	GATGGGACTCTTGTTCAT	48	GATGGGCCTCTTGTTCAT
17	GATGGGGCTCAAGTTCAT	49	GATGGGTCTCAAGTTCAT
18	GATGGGGCTCAGGTTTCAT	50	GATGGGTCTCAGGTTTCAT
19	GATGGGGCTCACGTTTCAT	51	GATGGGTCTCACGTTTCAT
20	GATGGGGCTCATGTTTCAT	52	GATGGGTCTCATGTTTCAT
21	GATGGGGCTCGAGTTCAT	53	GATGGGTCTCGAGTTCAT
22	GATGGGGCTCGGGTTCAT	54	GATGGGTCTCGGGTTCAT
23	GATGGGGCTCGCGTTCAT	55	GATGGGTCTCGCGTTCAT
24	GATGGGGCTCGTGTTCAT	56	GATGGGTCTCGTGTTCAT
25	GATGGGGCTCCAGTTCAT	57	GATGGGTCTCCAGTTCAT
26	GATGGGGCTCCGGTTCAT	58	GATGGGTCTCCGGTTCAT
27	GATGGGGCTCCCGTTCAT	59	GATGGGTCTCCCGTTCAT
28	GATGGGGCTCCTGTTCAT	60	GATGGGTCTCCTGTTCAT
29	GATGGGGCTCTAGTTCAT	61	GATGGGTCTCTAGTTCAT
30	GATGGGGCTCTGGTTCAT	62	GATGGGTCTCTGGTTCAT
31	GATGGGGCTCTCGTTCAT	63	GATGGGTCTCTCGTTCAT
32	GATGGGGCTCTTGTTCAT	64	GATGGGTCTCTTGTTCAT

正常な遺伝子に相当する配列である $5'$ ATGAACCGGAGGCCCATC $3'$ は、右から 3 列目、上から 3 行目の位置にある 4 2 番のプロープ DNA $5'$ GATGGGCCTCCGGTTCAT $3'$ とハイブリッドを形成することが期待される。

【 0 0 4 8 】

6 4 種の実験でも、完全マッチ以外に 1 塩基ミスマッチのハイブリッド体からの蛍光が予想される。完全マッチと 1 塩基ミスマッチとからなる予想される蛍光

パターンを図2に示す。

【0049】

2. マレイミド基導入基板の作製

(基板洗浄)

1インチ角のガラス板をラックに入れ、超音波洗浄用洗剤に一晩浸した。その後、洗剤中で20分間超音波洗浄を行い、その後、水洗により洗剤を除去した。蒸留水ですすいだ後、蒸留水のはいった容器中でさらに超音波処理を20分間行った。次に、あらかじめ加温してあった1N水酸化ナトリウム溶液に10分間浸した。引き続き水洗、蒸留水洗浄を行った。

【0050】

(表面処理)

1%シランカップリング剤水溶液（信越化学工業社製、商品名KBM603）に室温で20分浸し、その後、窒素ガスを両面に吹き付けて、水分を飛ばし、乾燥させた。120℃に加熱したオーブンで1時間バークしシランカップリング処理を完結させた。続いて、EMCS（N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide: Dojin社製）を2.7mg秤量し、DMSO/エタノールの1:1溶液に溶解した（最終濃度 0.3mg/ml）。シランカップリング剤処理を行ったガラス基板をこのEMCS溶液に2時間浸し、シランカップリング剤のアミノ基とEMCS溶液のカルボキシル基を反応させた。この状態でガラス表面にはEMCS由来のマレイミド基が表面に存在することになる。EMCS溶液と反応させたガラス板は蒸留水で洗浄後、窒素ガスで乾燥させ、DNAとの結合反応に用いられる。

3. DNAの基板への結合反応

(64種DNAプローブの合成)

5'末端にSH基（チオール基）を有する上記64種のプローブDNAは、（株）ベックスに依頼し合成した。

(DNAプローブの吐出)

上記64種のDNAそれぞれ用いて以下の吐出操作を行なった。各DNAを水に溶解し、SGクリア（グリセリン7.5%、尿素7.5%、チオジグリコール7.5%、アセチレノールEH1%を含む水溶液）を用いて最終濃度8μMにな

るよう希釈した。少量のサンプルが吐出できるように改造したBJプリンター用ヘッドBC62（キヤノン社製）のノズルにこのDNAの溶液を $100\mu\text{l}$ 充填した。各ヘッドあたり6種のDNAが吐出できるようにして2つヘッドを用い、一度に12種のDNAを吐出し、ヘッドを6回交換して、64種のDNAのそれぞれのスポットが独立して形成されるように吐出させた。

【0051】

各プローブを、スポット径が $70\mu\text{m}$ 、ピッチが $200\mu\text{m}$ となるように設定し、 8×8 のマトリクス状に64種を並べてスポットティングした。その後、30分加湿チャンバー中に放置し、プローブDNAを基板に結合させる反応を行った。

・ハイブリダイゼーション反応

（ブロッキング反応）

反応終了後、 $1\text{M NaCl}/50\text{mM}$ リン酸緩衝液（ $\text{pH}7.0$ ）溶液にて基板を洗い、ガラス表面のDNA溶液を完全に洗い流した。その後、2%ウシ血清アルブミン水溶液中に浸し、2時間放置し、ブロッキング反応を行った。

（モデル検体DNAの合成）

p53遺伝子の正常な配列を持ち、プローブDNAと同じ領域で同じ長さの標識DNA No.1を作製した。配列は下に示す通りで、5'末端にはローダミンを結合してある。

【0052】

No.1: $5'$ Rho-ATGAACCGGAGGCCCATC $3'$

（ハイブリダイゼーション反応条件）

DNAアレイ基板の入ったハイブリダイゼーション反応用の袋に 100mM NaCl を含む 10nM モデル検体DNA溶液を 2ml 入れ、最初に 80°C で10分加熱後、インキュベーターの温度を 45°C に下げ、そのまま15時間反応させた。

5. 検出

（方法）

検出は、蛍光顕微鏡（ニコン社製）に画像解析処理装置ARGUS（浜松ホトニクス社製）を接続して行った。

（結果）

モデル系である18merの標識DNA No.1とのハイブリダイゼーション反応の結果得られた蛍光量を、図4に示す。蛍光量の最大値は完全に相補的である42番のプロープである。その蛍光量を最大値(100%)として、その20%にしきい値を設け、それ以上のところを黒く塗りつぶしてある。

【0053】

No.10, 26, 58の部分のスポットも蛍光をもち、予想パターン図2と良く一致していることがわかる。更にしきい値を下げることにより、予想パターンと一致する。つまり、上記3スポットに加え、完全マッチを中心に1塩基ミスマッチ配列の部分が縦横のラインに並ぶ。

【0054】

(実施例2: パターン認識II)

実施例と同様に64種のプロープからなるDNAアレイ基板を作製し、モデル検体としてNo.2の配列を持つローダミン標識DNAとのハイブリダイゼーション反応を行った。No.2の配列は図1のNo.46プロープと相補的である。

【0055】

No.2: 5' Rho-ATGAACCAGAGGCCCATC3'

ハイブリダイゼーション反応条件も実施例1と同様である。

【0056】

実施例1と同様、予想されるパターンを求めたのが、図5である。それに対し、得られた結果を図6に示す。しきい値を最大値の10%に設定してハイブリダイゼーション反応の結果を黒ぬりで示す。予想との対応がよい。

【0057】

(実施例3: パターン認識 III)

実施例2と同じモデル検体DNAを用いて実施例2と同様な実験を行った。但し、ハイブリダイゼーション反応に用いる検体DNA濃度を5nMとし、40℃で一晩反応させた。得られた結果を図7に示す。

【0058】

しきい値を50%にすると、1塩基ミスマッチの34及び62番のプロープの位置(斜線部)に蛍光が現れ、さらに30%にまでしきい値を下げると、予想パ

ターンに合う結果となる。この場合、N0.6と22の2塩基ミスマッチも検出されるが、1塩基ミスマッチが構成するパターンからのずれとして、2塩基ミスマッチであることが判別でき、完全マッチのスポットが46番であることが判定可能である。

【0059】

【発明の効果】

このように、単にハイブリッドの有無のみで判定する従来の方法に比べ、本発明の方法はさらに1塩基ミスマッチの蛍光量を考慮に入れることにより精度の良い検出が可能となった。

【0060】

DNAプローブとのハイブリッドは、それぞれの配列により熱安定性が異なるため、必ずしも完全マッチの場合が圧倒的に安定で強い蛍光を発するという保証はない。パターンでの判定は、1スポットのみで判断する場合に比べ、より確実な判断という点で有利である。

【0061】

基板上的ゴミやハイブリダイゼーション反応時のアーティファクトといったことが原因で、どれが最強のスポットで完全マッチのスポットであるか判断できないことも多い。その点、本発明におけるパターンでの判定は、多少の蛍光量のばらつきがあってもそれを補えることが可能となる。

【0062】

従って、本発明によって、遺伝子の変異を、簡便かつ効率的にスクリーニングできる検査方法を提供することができる。

【0063】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>Canon INC.

<120>A method of analyzing a base sequence of a nucleic acid

<130>3888012

<160>64

<210>1

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>1

gatgggactc aagtt cat

<210>2

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>2

gatgggactc aggtt cat

<210>3

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>3

gatgggactc acgtt cat

<210>4

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>4

gatgggactc atgtt cat

<210>5

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>5

gatgggactc gagtt cat

<210>6

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>6

gatgg gactc gggtt cat

<210>7

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>7

gatgggactc gcgttcat

<210>8

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>8

gatgggactc gtgttcat

<210>9

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>9

gatgggactc cagttcat

<210>10

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>10

gatgggactc cggttcat

<210>11

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>11

gatgggactc ccgttcat

<210>12

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>12

gatgggactc ctgttcat

<210>13

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>13

gatgggactc tagttcat

<210>14

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>14

gatgggactc tggttcat

<210>15

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>15

gatgggactc tcgttcat

<210>16

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>16

gatgggactct tgttcat

<210>17

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>17

gatggggctc aagttcat

<210>18

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>18

gatggggctc aggttcat

<210>19

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>19

gatggggctca cgttcat

<210>20

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>20

gatggggctc atgttcat

<210>21

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>21

gatggggctcg agttcat

<210>22

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>22

gatggggctc gggttcat

<210>23

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>23

gatggggctc gcgttcat

<210>24

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>24

gatggggctc gtgttcat

<210>25

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>25

gatggggctc cagttcat

<210>26

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>26

gatggggctc cggttcat

<210>27

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>27

gatggggctc ccgttcat

<210>28

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>28

gatggggctc ctgttcat

<210>29

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>29

gatggggctct agttcat

<210>30

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>30

gatggggctc tggttcat

<210>31

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>31

gatggggctc tcgttcat

<210>32

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>32

gatggggctc ttgttcat

<210>33

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>33

gatgggcctc aagttcat

<210>34

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>34

gatgggcctc aggttcat

<210>35

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>35

gatgggcctc acgttcat

<210>36

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>36

gatgggcctc atgttcat

<210>37

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>37

gatgggcctc gagttcat

<210>38

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>38

gatgggcctc gggttcat

<210>39

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>39

gatgggcctc gcgttcat

<210>40

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>40

gatgggcctc gtgttcat

<210>41

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>41

gatgggcctc cagttcat

<210>42

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>42

gatgggcctc cggttcat

<210>43

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>43

gatgggcctc ccgttcat

<210>44

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>44

gatgggcctc ctgttcat

<210>45

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>45

gatgggcctc tagttcat

<210>46

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>46

gatgggcctc tggttcat

<210>47

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>47

gatgggcctc tcgttcat

<210>48

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>48

gatgggcctc ttgttcat

<210>49

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>49

gatgggtctc aagttcat

<210>50

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>50

gatgggtctc aggttcat

<210>51

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>51

gatgggtctc acgttcat

<210>52

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>52

gatgggtctc atgttcat

<210>53

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>53

gatgggtctc gagttcat

<210>54

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>54

gatgggtctc gggttcat

<210>55

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>55

gatgggtctc gcgttcat

<210>56

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>56

gatgggtctc gtgttcat

<210>57

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>57

gatgggtctc cagtcat

<210>58

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>58

gatgggtctc cggttcat

<210>59

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>59

gatgggtctc ccgttcat

<210>60

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>60

gatgggtctc ctgttcat

<210>61

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>61

gatgggtctc tagttcat

<210>62

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>62

gatgggtctc tggttcat

<210>63

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>63

gatgggtctc tcgttcat

<210>64

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>64

gatgggtctc ttgttcat

【図面の簡単な説明】

【図 1】

6 4 種のプロープを用いた場合の配置例を示す。

【図 2】

標的核酸の配列に対して基板上のポジティブと判断される領域の配置のパターンを示す図である。

【図 3】

標的核酸に対する変異配列において基板上でポジティブと判断される領域の配置のパターンを示す図である。

【図 4】

実施例1で得られた蛍光量のパターンを示す図である。

【図5】

実施例2において予想されるパターンを示す図である。

【図6】

実施例2で得られた蛍光量のしきい値10%でのパターンを示す図である。

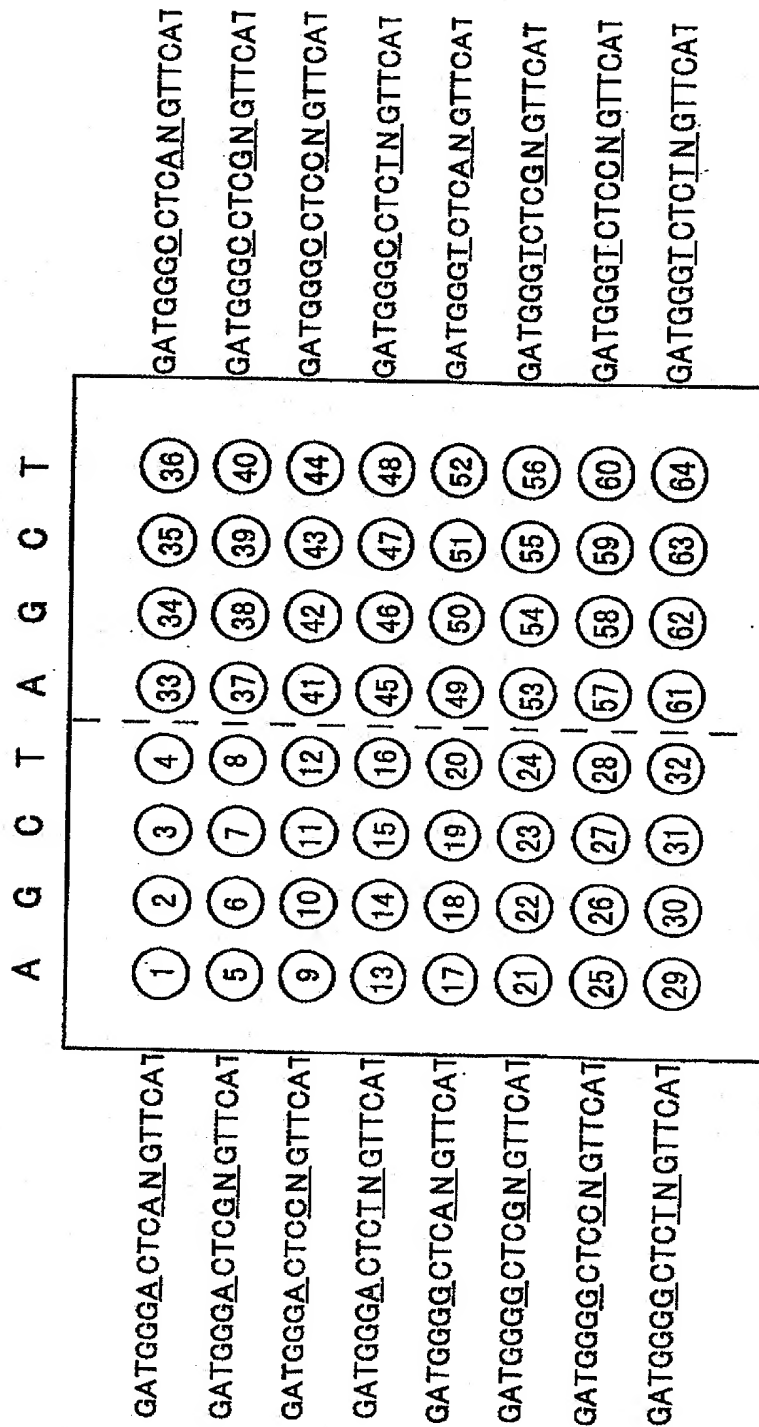
【図7】

実施例3で得られた蛍光量のパターンを示す図である。

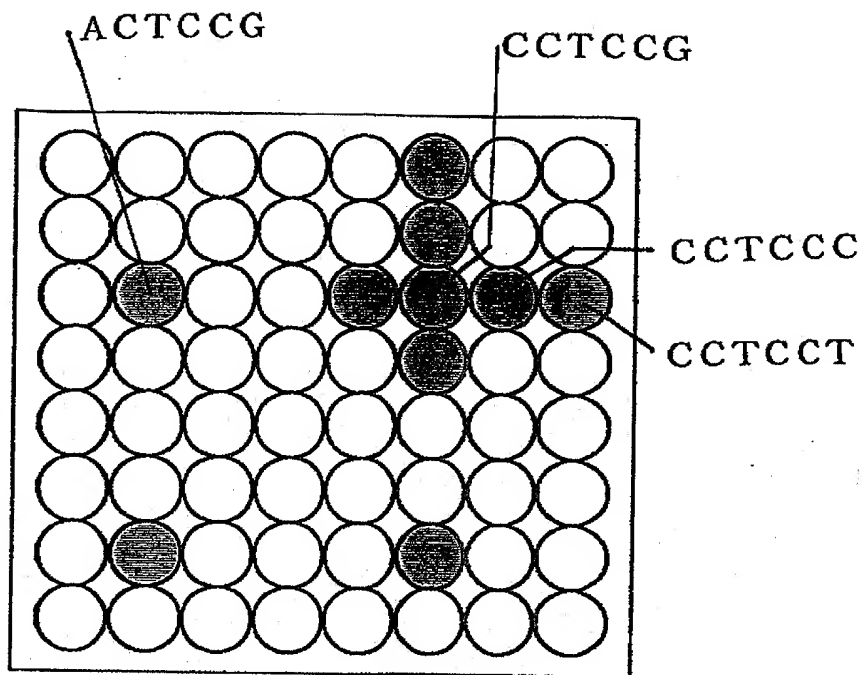
【書類名】

図面

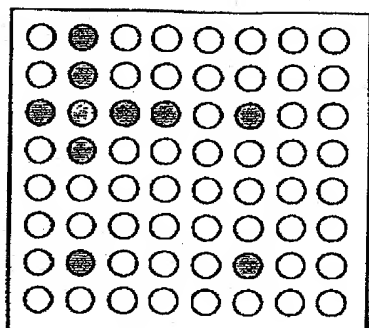
【図 1】



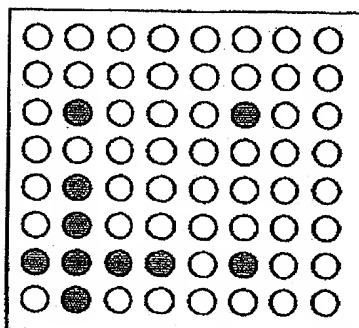
【図2】



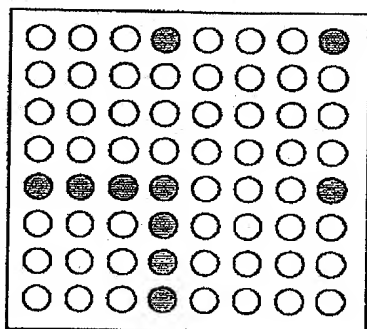
【図3】



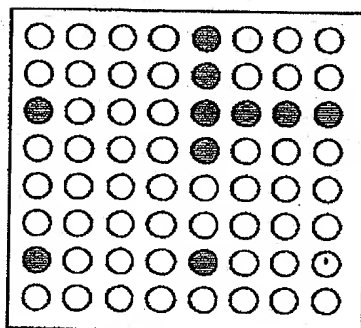
ATGAACCGGAGTCCCATC



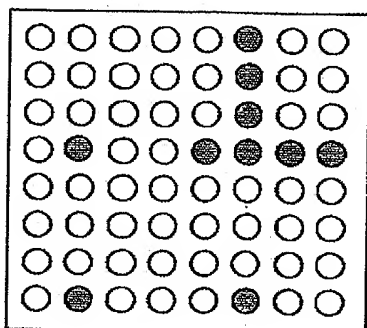
ATGAACCGGAGCCCCATC



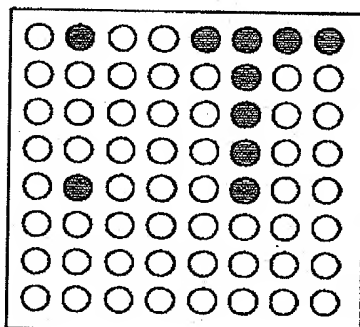
ATGAACATGAGCCCCCATC



ATGAACIGGAGGCCCATC

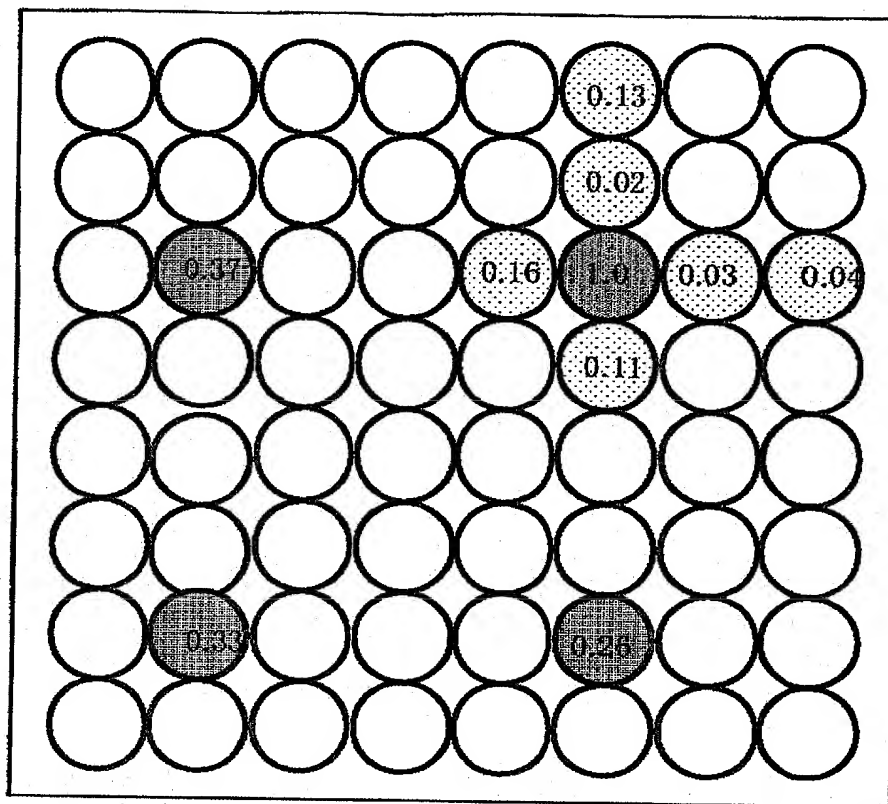


ATGAACCAAGAGGCCCATC

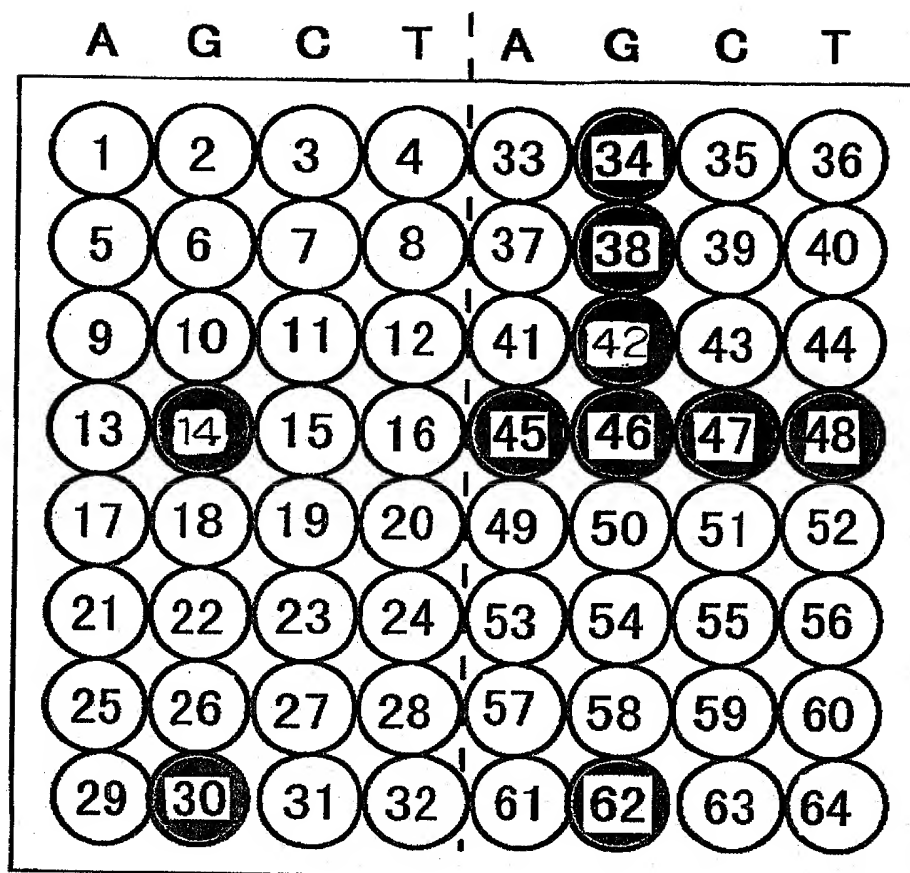


ATGAACCTGAGGCCCATC

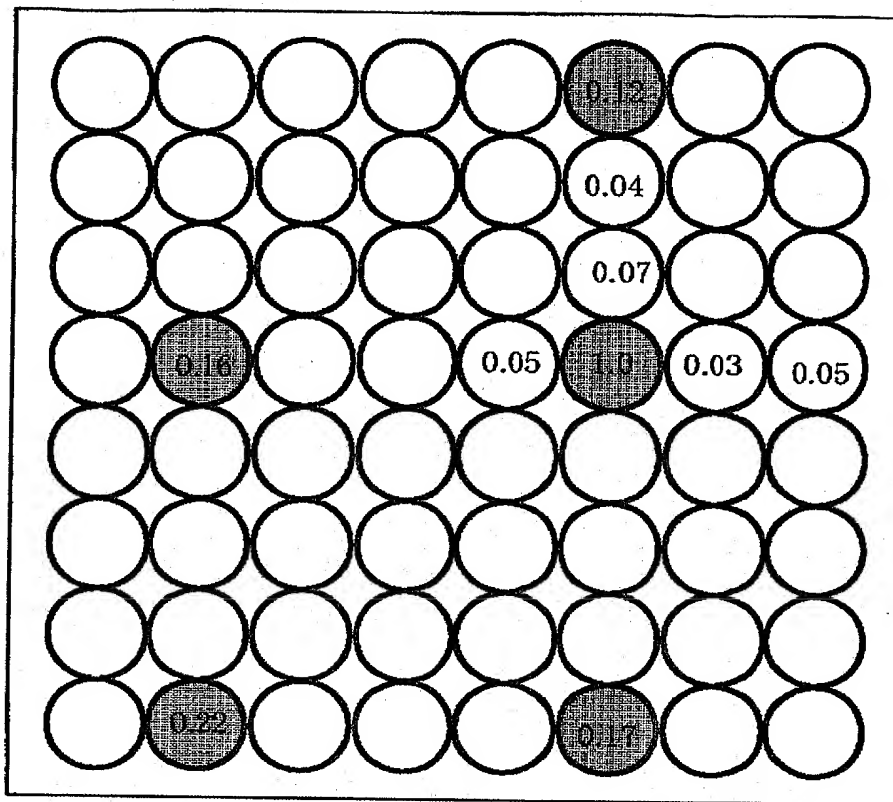
【図4】



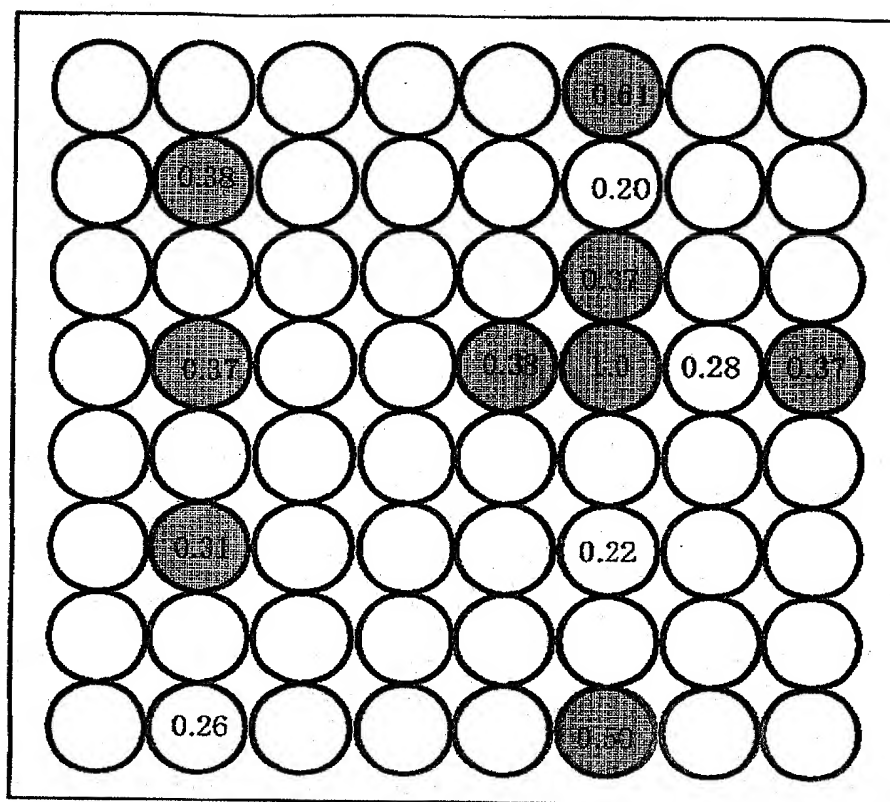
【図5】



【図6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 複雑な解析を必要とせず、正確に遺伝子の配列を決定する方法を提供すること。

【解決手段】 該未知の塩基配列の予想される複数の塩基配列の各々に対して相補的な塩基配列を有する1番～n番 ($n \geq 2$) の複数種の一本鎖核酸プローブの各々が基体上に互いに隔離されるように配置されているプローブアレイを用意し、複数種の一本鎖核酸プローブ毎にその完全相補一本鎖核酸を反応させた際の蛍光量を測定して、所定の蛍光量の位置をポジティブとしたパターンを作成し、標的一本鎖で同様にして得られるパターンと一致するパターンに用いた完全相補一本鎖核酸の配列から標的一本鎖核酸の配列を特定する。

【選択図】 図2

特2000-263506

職権訂正履歴（書類修正）

特許出願の番号	特願2000-263506
受付番号	50001111808
書類名	特許願
担当官	寺内 文男 7068
作成日	平成12年 9月22日

<修正内容>

【書類名】 【特許請求の範囲】 を追加・記録する。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001007]

1. 変更年月日 1990年 8月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
氏 名 キヤノン株式会社